

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 6 月 17 日 (17.06.2004)

PCT

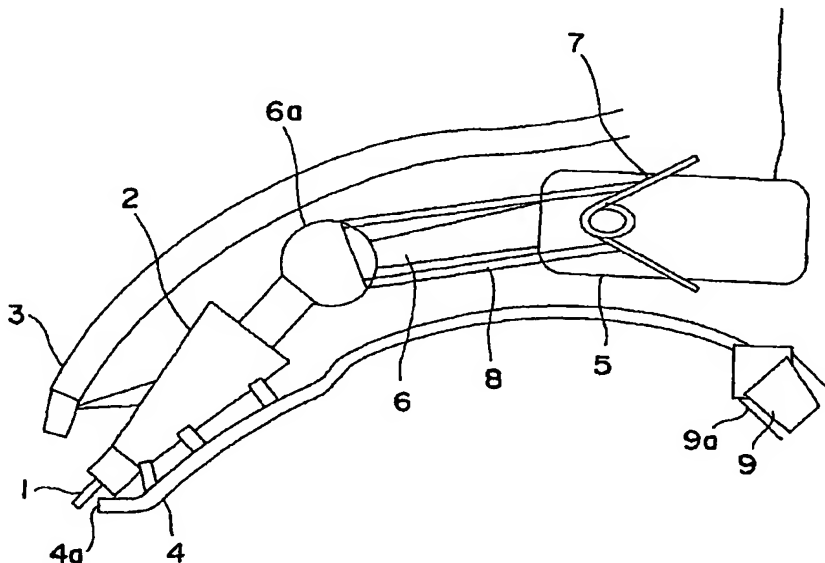
(10) 国際公開番号
WO 2004/049964 A2

- (51) 国際特許分類: A61C (71) 出願人 および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014953 (72) 発明者: 立花 克郎 (TACHIBANA, Katsuro) [JP/JP];
〒810-0045 福岡県 福岡市中央区 草香江 2-1-11 エ
(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 21 日 (21.11.2003) レンシア 草香江 201 号 Fukuoka (JP). 中島 美砂子
(NAKASHIMA, Misako) [JP/JP]; 〒813-0014 福岡県 福
岡市東区 香椎台 1-18-7 Fukuoka (JP).
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 小堀 益, 外 (KOHORI, Susumu et al.); 〒
812-0011 福岡県 福岡市博多区 博多駅前一丁目 1-1
(26) 国際公開の言語: 日本語 博多新三井ビル Fukuoka (JP).
(30) 優先権データ: (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
特願 2002-339944 2002 年 11 月 22 日 (22.11.2002) JP BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
特願 2003-389975 2003 年 11 月 19 日 (19.11.2003) JP DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: DRUG TO BE INTRODUCED TOOTH OR PERIODONTAL TISSUE AND APPARATUS FOR INTRODUCING DRUG TO TOOTH OR PERIODONTAL TISSUE

(54) 発明の名称: 歯あるいは歯周組織への導入用薬剤および歯あるいは歯周組織への薬剤導入装置



(57) Abstract: An apparatus for introducing a drug, which is to be introduced into a tooth or a periodontal tissue using an ultrasonic energy and causing little damage. The drug for introduction, which is a mixture to be introduced into a tooth or a periodontal tissue for a therapeutic purpose with the use of an ultrasonic energy and comprises a mixture of plasmid DNA or a drug with fine bubbles, is introduced into the tooth or the periodontal tissue by using an apparatus for drug introduction comprising an ultrasonic wave oscillator having at the tip thereof a detachable ultrasonic wave-oscillating unit whereby the target site of the tooth is irradiated with the ultrasonic wave, and a drug extruder for feeding the drug to be introduced into the tooth toward the target site.

[続葉有]



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書なし; 報告書を受け取り次第公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明は超音波エネルギーにより導入する傷害性の少ない、歯あるいは歯周組織への導入用薬剤の歯あるいは歯周組織の薬剤導入装置であって、導入用薬剤は、超音波エネルギーにより歯あるいは歯周組織に導入して治療する混合物であって、プラスミドDNAあるいは薬剤と微小気泡との混合物からなる導入用薬剤を、超音波を歯の標的部に照射する、取り外しできる超音波発振部を先端部に備えた超音波発振器と、標的部に歯への導入用薬剤を供給する薬物押し出し装置とを備えた薬剤導入装置で歯あるいは歯周組織に導入する。

明 細 書

歯あるいは歯周組織への導入用薬剤および歯あるいは歯周組織への薬剤導入装置

5

技術分野

本発明は、超音波エネルギーにより歯あるいは歯周組織に導入される導入用薬剤および歯あるいは歯周組織への薬剤導入装置に関する。

10 背景技術

疾患に関わる遺伝子情報を治療へ応用するゲノム医療が近年急速に進展しつつある。そのひとつとして遺伝子治療は、癌、糖尿病、心疾患、血管疾患、神経変性疾患など広範な疾患へ臨床応用がなされつつある。遺伝子治療には、細胞に傷害を与えず目的遺伝子が標的細胞に効率良く組み込まれ、その遺伝子が発現して蛋白合成がなされ機能が発現する遺伝子導入が必要である。

15

遺伝子の導入法には、ウイルスが元来もつ細胞侵入機構を利用するウイルスベクター法と、化学的（リン酸カルシウム法、リポソーム法）あるいは物理的操作（遺伝子銃、エレクトロポレーション法）による非ウイルスベクター法があげられる。

20

一方、骨形成因子（BMPs : B o r n M o r p h o g e n e t i c P r o t e i n s）は歯牙の発生に深く関与することが知られており、象牙芽細胞が最終分化する時期にBMP2（B o n e M o r p h o g e n e t i c P r o t e i n 2）、BMP7およびGDF11（G r o w t h / d i f f e r e n t i a t i o n F a c t o r 1 1）/BMP11のmRNA発現がみられる。ヒトリコンビナントBMPs蛋白を吸着させたビーズを応用する、あるいはBMP遺伝子をエレクトロポレーションにより遺伝子導入すると象牙芽細胞のマーカーであるDSP（D e n t i n S i a l o p r o t e i n）の発現が誘導される。また i n v i v o

25

において、生活歯髄切断面にヒトリコンビナントBMPs蛋白を応用すると大量の修復象牙質形成がみられる。このことから、ヒトリコンビナントBMPsは歯髄細胞の象牙芽細胞への分化に関与し、象牙質形成を促進すると考えられ、覆髄剤として臨床応用する可能性が示唆されている。

- 5 しかしながら、ウイルスベクターでは導入効率は高いが、挿入により変異原性が生じる。また、レトロウイルスは、ウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれるため、外来遺伝子を安定に長期に発現させられるが、発癌性があり、分裂している細胞にしか遺伝子を導入できない。アデノウイルスは細胞傷害性と細胞性免疫反応が強く、発現持続が十分でない。また正電荷型リポソームは導入できる遺伝子サイズに制限がなく、複製されず、免疫反応がほとんど起こらないが、導入効率が低く、細胞毒性がある。
- 10

- これらの導入法に対して、エレクトロポレーション法では遺伝子導入量に限界がなく、ウイルスなどの特殊なDNA構造に組み込む必要はなく、暫間的、一過性なので安全性が高い。しかも導入効率が他の方法に比べ高く有利である。しかしながら、電極があたったところでは組織に損傷を与え、遺伝子導入の不均一性から、露髄面が完全に象牙質で覆われることが困難であった。
- 15

発明の開示

- 20 そこで本発明は、超音波エネルギーにより導入する傷害性の少ない、歯あるいは歯周組織への導入用薬剤および歯あるいは歯周組織の薬剤導入装置を提供するものである。

- 本発明による歯あるいは歯周組織への導入用薬剤は、超音波エネルギーにより歯に導入して治療する混合物であって、プラスミドDNAあるいは薬剤と微小気泡との混合物からなることを特徴とする。
- 25

 また、本発明の歯あるいは歯周組織への薬剤導入装置は、超音波を歯あるいは歯周組織の標的部に照射する、取り外しできる超音波発振部を先端部に備えた超音波発振器と、標的部に歯への導入用薬剤を供給する薬物押し出し装置とを備えたことを特徴とする。

本発明では超音波エネルギーを利用するので、電氣的遺伝子導入法に比べて、特殊な電極を開発する必要もなく、その電極棒の先があたった面の必然的壊死を免れた。また電氣が流れた部位のみの限局的遺伝子導入に比べて、歯髓面に広範囲に効率よく遺伝子が導入された。

5 また、*in vivo*において生活歯髓切断面に超音波遺伝子導入した場合においても、露出した歯髓表面全体にわたり均一に遺伝子が導入され、修復象牙質は露髓面全体に形成されていたことから、電氣的遺伝子導入法より有利である。

10 また、現在遺伝子導入に多く用いられているアデノウイルス・ベクターは発癌性、毒性、免疫反応などの安全性について非常に問題となっている。

本発明により、超音波を用いてプラスミドDNAを効率的にしかも安全に露髓面に遺伝子導入できることが示されたことから、今後、新しい覆髓法として臨床応用が可能となる。

15 本発明では、従来の単に薬剤を塗布あるいは貼薬する方法に比べて、薬剤が象牙細管内により深く浸透し、超音波造影剤併用による化学的・物理的相乗効果により、即座に確実に無菌化をはかることができ、非常に有利である。本発明の超音波を用いた新しい虫歯治療あるいは抜髓・感染根管治療あるいは歯周組織疾患の治療により、治療の能率化によるチェアタイム、通院回数の減少、歯の痛み、咬合不全による国民の生産性の減少の防
20 止、歯髓の確実な保存しいては歯の保存によるQOLの向上、医療費の削減など、国民・国家に多大な影響が与えられることが期待される。

図面の簡単な説明

25 図1は本発明の処理方法に使用する薬物投与装置の全体図である。図2(a)は投与装置の操作装置の説明図、(b)はモニターの映像を示す図である。図3は超音波素子の振動方向の説明図である。

発明を実施するための最良の形態

マイクロバブルとして用いたOptisonは、アルブミンでできた赤

血球より小さいカプセルの殻の中にフロロカーボン（perfluorocarbon）が含まれている。マイクロバブルは、弾性、圧縮性があり、水より密度が低く、生体組織と体液の間で音響インピーダンスの不均衡を生じる。よってこのような性質により超音波を効率良く反射する。また、

5 マイクロバブルはキャビテーションのためのエネルギー閾値を低下させる。キャビテーションにおいて、超音波エネルギーはミクロ領域に濃縮され、キャビテーションは小さな衝撃波を引き起こし細胞透過性を増加させる。キャビテーションはマイクロバブルを破壊し、マイクロバブルに付着あるいは封入されていた薬物や遺伝子が放出される。いずれガスは体内に吸収

10 されるが、超音波の照射によってカプセルの崩壊を時間的、空間的に制御できる。マイクロバブルはまた、細胞に特異的なあるレセプターをターゲットにすることが可能である。

本発明では、歯髄組織に超音波エネルギーを利用して、プラスミドDNAをマイクロバブルと混合した形でGFP（Green Fluorescence Protein）遺伝子を導入する。その結果、Optisonが10%前後の含有率で、周波数1MHz、強度0.5W/cm²、照射時間30秒が最も効率よく歯髄面上に遺伝子導入できる条件であることが判明した。

15

このような条件下での超音波による遺伝子の導入では歯髄細胞組織に傷害や壊死を与えることなく、細胞核内に遺伝子を導入することが可能であった。

20

同様の条件下で歯髄組織にGDF11プラスミドDNAを超音波エネルギーにより導入を行ったところ、マウス歯胚間葉を用いて電氣的遺伝子導入を行った場合と同様に、歯髄細胞の象牙芽細胞への分化が誘導された。

25 図1は本発明の歯への薬剤導入装置の全体図、図2（a）は導入装置の操作装置の説明図、（b）はテレビモニターの画像の一例を示す図、図3は超音波素子の振動方向の説明図である。

図1において、導入装置は、超音波発振器1、超音波発振器1のケース2に支持された照明・内視鏡3および薬物投与チューブ4で構成される。

超音波発振器 1 のケース 2 は、ハンドル 5 と角度を調整できる、関節部 6 を備えた屈折部材 6 a と連結されている。屈折部材 6 は、ハンドル 5 に設けられた角度調整つまみ 7 と関節部 6 をワイヤ 8 で結び、角度調整つまみ 7 を操作することにより関節部 6 を動かして超音波発振器 1 の角度を調整する。超音波発振器 1 は、先端の大きさは $0.1 \times 0.1 \times 0.1$ mm から $1 \times 1 \times 1$ cm の大きさで、交換可能にして、使い捨てにしてもよい。

照明・内視鏡 3 は、超音波の標的部 1 1 (図 2) を照明する角度に調整可能にケース 2 に支持されている。

薬物投与チューブ 4 の先端の開口部 4 a も標的部 1 1 に薬物を供給する角度に調整可能にケース 2 に支持され、他端には薬物を押し出すためのトリガー 9 a を備えた薬物押し出し装置 9 が設けられている。

図 2 (a) において、操作装置 1 0 は超音波発振器・増幅器を内蔵し、超音波の周波数、強度を調整する調整手段として、超音波強度調整つまみ 1 0 a、周波数調整つまみにより超音波強度を調整する。また、内視鏡 3 からの映像を画像処理して、図 2 (b) に示すように、テレビモニター 1 0 b に標的部 1 1 の映像を表示することができる。フットペダルスイッチ 1 0 c により超音波発振器 1 をオンオフすることができる。

図 3 において、超音波の周波数を $100 \text{ kHz} \sim 10 \text{ MHz}$ を変化させて横方向 (周波数 A) あるいは縦方向 (周波数 B) に同調させることができ、約 1 MHz が適している。超音波強度は $0.5 \sim 10 \text{ W/cm}^2$ に調整可能であり、超音波強度約 2 W/cm^2 が適している。A、B の周波数を切り換えることによって、同一の超音波発振素子で超音波の発振方向を自由に変えることができる。また、切り替え周波数はあらかじめ設定されていて、2 方向とは限らず、使用者が自由に選べる。なお、超音波の照射時間は、数秒から 10 分程度である。

本発明の導入装置の操作について説明する。薬物押し出し装置 9 に薬物を充填した後、ハンドル 5 を持って角度調整つまみ 7 で超音波発振器 1 の角度を調整し、超音波の周波数、強度をセットした後、照明・内視鏡 3 を ON し、超音波発振器 1 を駆動するとともに、薬物押し出し装置 9 のトリ

ガー 9 a を引いて薬物を標的部 1 1 に注入し、標的部 1 1 の様子をテレビモニター 1 0 b で観察しながら遺伝子や薬剤の導入を行っていく。

実施例 1

新鮮抜去ウシ前歯の歯根側面よりタービン用ダイヤモンドラウンドバー
5 # 4 4 0 を用いて歯髄に到達する窩洞を形成し、pEGFP-N3 (Clontech, Palo Alto) にTIMP promoter を結合させたプラスミド (TIMP-pEGFP) を注入した。プラスミドDNA (25 μ g) はあらかじめ超音波造影剤Optison (Molecular Biosystems Inc., San Diego) を1
10 : 3 で混合した。窩洞内を完全にUltrasonic Conductivity Gel液 (Nishimoto Sangyo Co. LTD) で覆い、Gel 面上からソニトロン1000インピボ用1MHz (リッチマー社・ST1000V-W) にて超音波を照射した。超音波強度は0.5 W/cm²あるいは1 W/cm²、周波数は1 MHz を使用した (照射時間15、30、60秒)。その後歯髄を摘出して、10%仔ウシ血清含有DMEM中で、Trowell型の器官培養を行った。24時間後、実
15 体蛍光顕微鏡にてGFPの蛍光発色の観察を行った。

その結果、超音波を照射した群のGFPの量は非照射群に比べ完全に有意差が認められ、非照射群にはほとんどGFPは見られなかった。遺伝子
20 導入効率の促進作用が証明され、その導入効率は超音波の強度および照射時間に依存した。すなわち、周波数1 MHz の場合、強度は0.5 W/cm²、照射時間30秒が最もGFPが窩洞内の歯髄組織にびまん性に分布しており、組織傷害性がなく、遺伝子導入効率が最も良いと考えられた。

実施例 2

25 超音波造影剤Optisonの濃度の至適化について試験した。実施例1と同様にして、超音波造影剤Optisonの濃度を変化させて、導入効率の比較を行った。すなわち、プラスミドDNA (25 μ g) に対してOptisonを0.001%、5%、10%、20%、50%、75% に調整し、0.5 W/cm²周波数は1 MHz、60秒、超音波照射した。

コントロールとしてはOptison 0%で照射、あるいはOptison 5%で非照射を用いた。

その結果、Optisonの含有率の変化による影響は、プラスミドDNAをOptisonと混合しない場合、超音波照射群および非照射群の
5 両方ともほとんどGFPは見られなかった。

また、Optison含有率0.001%で導入率が上昇し、Optison含有率5-10%ではほぼ一定した導入率が得られ、20%ではやや減少、50%以上では導入率は激減した。

実施例 3

10 歯髄組織への影響について試験した。実施例1と同様に、ウシ歯髄組織にOptisonを5%含む20 μ gのTIMP-pEGFPプラスミドを応用し、0.5W/cm²、周波数1MHz、照射時間30秒で超音波照射し、器官培養2日後に歯髄組織を急速凍結した。20 μ mの凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡（カールツアイス社、LSM410、アルゴンレーザー、B 488nm、30mW）にて細胞内GFPの蛍光発色を
15 コンピュータ画像観察した。また、HE染色により、炎症や壊死所見の観察を行った。

また、TIMP-pEGFPプラスミドを含まずOptisonのみで照射、あるいはTIMP-pEGFP（Optison 5%含）に非照射
20 を用いた。

その結果、遺伝子導入して器官培養2日後の歯髄組織をHE染色して形態観察したところ、炎症や壊死所見は認められなかった。

また、共焦点レーザー顕微鏡下でGFPの蛍光発色をコンピュータ画像解析したところ、遺伝子導入により表層下200 μ mまで、細胞内にGFP
25 P遺伝子を取り込まれていることが判明した。コントロールのTIMP-pEGFPプラスミドを含まずOptisonのみで照射したものおよびTIMP-pEGFP（Optison 5%含）に非照射ものではGFPは全く見られなかった。

実施例 4

mGDF11-TIMP-pEGFPのプラスミド20 μ g (Optison 5%含) を2と同様に超音波遺伝子導入した。

また、TIMP-pEGFP (Optison 5%含) あるいはmGdf11-TIMP-pEGFP (Optison 5%含) を応用するが非
5 照射を用いた。器官培養7日後の歯髓を4%パラホルムアルデヒドで固定して、象牙芽細胞のマーカーであるDentin Sialoprotein (DSP) を用いてwholemount in situ hybridizationを行い、DSP mRNAの発現を検索した。

その結果、超音波遺伝子導入後7日目の器官培養歯髓組織をウシDSP
10 のプローブを用いてwhole-mount in situを行ったところ、窩洞内の超音波遺伝子導入部位に一致して、DSP mRNA発現がびまん性に広がってみられた。

また、コントロールのTIMP-pEGFP (Optison 5%含) あるいはmGdf11-TIMP-pEGFP (Optison 5%含)
15 で非照射標本ではDSP mRNA発現は見られなかった。したがって、GDF11の超音波遺伝子導入により、歯髓細胞の象牙芽細胞への分化が促進されたことが分かった。

実施例5

一歳前後のイヌ6頭の上下顎犬歯計24本をエアータービンにて露髄させ、次亜塩素酸ソーダと過酸化水素水による交互洗浄後、エンジン用ラウ
20 ンドバー#18にて生活歯髓切断を行った。再度交互洗浄と生食水による洗浄後、断面を乾燥させ、Optison 5%とmGdf11-TIMP-pEGFPのプラスミド40 μ gを含むPBS溶液10 μ lを歯髓切断面上に注入し、気泡を入れないように注意しながらUltra/Phon
25 ic Conductivityゲル液で窩洞内を満たした。ゲル液の上から超音波を、強度は0.5W/cm²、周波数1MHz、照射時間30秒で照射した (計14本)。

また、TIMP-pEGFPのプラスミド40 μ gを含むPBS溶液 (計6本) あるいはmGDF11-TIMP-pEGFPを注入のみで超音波

照射をしないもの（計4本）を用いた。その後、ゲル液を生理食塩水で洗い流し、切断面上に吸収性スポンゲルを軽圧にておき、その上を燐酸亜鉛セメントならびに化学重合レジンにて封鎖した。1ヶ月後、パラフィン切片を作製し、修復象牙質形成の形態学的観察を行った。

- 5 観察の結果、イヌの生活歯髄切断歯髄にG D F 1 1 - T I M P - p E G F Pを超音波遺伝子導入すると、一ヶ月後にリコンビナントB M P蛋白をコラーゲンとともに応用した場合と同様に断髄面上歯髄に大量の修復象牙質形成が見られた。

- 10 また、修復象牙質は象牙芽細胞が並ぶ細管構造をもつ象牙質ではなく、細胞が基質に埋もれている骨様象牙質がほとんどであった。超音波遺伝子を行っていないあるいはp E G F Pのみを遺伝子導入した場合（図5 B）には、骨様象牙質形成は見られなかった。

したがって、超音波エネルギーを用いてG D F 1 1 遺伝子を歯髄へ直接遺伝子導入する覆髄法の有効性が認められた。

15 実施例6

- 歯の延命化のためには歯質切除を最小限にとどめ、露髄の可能性を減少させて可及的に歯髄を残すことが是非必要である。しかし、従来より齲蝕治療は無菌化をはかるため感染歯質の徹底除去を原則とし、したがって完全に無菌化するには大量に歯質を削除し結果として歯髄を失うことになりかねない。

- 20 本実施例は、超音波エネルギーを利用して抗菌剤あるいは消毒剤、抗炎症剤と併用して象牙細管内あるいはさらに歯髄内に深く浸透させ、歯髄内に侵入した齲蝕原性菌を無菌化するものであり、即効性に、化学的ならびに物理的に細菌を完全死滅させてより炎症を鎮めると同時に、超音波エネルギーにより、歯髄組織幹細胞を活性化させ、歯髄再生力を強化する。あるいは象牙芽細胞の分化を促進作用させ、より早期に修復象牙質を再生させるものである。

本実施例では次の効果が得られる。

1. 抗菌剤が象牙細管内を通過してより深く浸透するため、象牙質にただ塗

布した場合に比べて、細管内深くに存在する細菌により到達しやすく、虫歯切削量が少なくすむ。

2. 残存歯質が少ない場合には、細管を通して感染歯髄組織にも作用が及ぶため、直接に露髄させて薬剤を応用せずとも抗炎症剤、抗菌剤を導入できる。

3. 超音波造影剤のバブルと併用した超音波の物理的細菌壁の破壊効力により、抗菌剤の薬効が強化される。耐性菌およびトレラント菌の出現を阻止できる。

4. 薬剤の即効性が期待できる。

10 5. 歯髄組織幹細胞を活性化し、歯髄再生力を強化できる。

超音波エネルギーにより、歯髄組織幹細胞が活性化され、歯髄再生力を強化できる。また、象牙芽細胞の機能亢進により、齲蝕により変性したコラーゲンやリン蛋白などの基質蛋白代謝が高まり、再石灰化可能となる。さらに、象牙芽細胞の分化促進作用により、より早期に修復象牙質を再生可能となる。この際、定期的に歯の表面から、超音波刺激を与えることも有効な手段となる。

6. フッ素入りの歯磨剤を用いてハブラシのように歯面清掃を行いながら歯牙表面の細菌を超音波エネルギーとフッ素により殺菌することによる齲蝕予防する。

20 実施例 7

齲蝕原性菌について試験した。

(1) 細管内到達距離に及ぼす超音波の出力、照射時間の影響について試験した。ヒト新鮮抜去智歯を用いて、咬合面に直径 6 mm、深さ 3 mm の窩洞を形成し、Optison 5% 含有、抗生物質テトラサイクリン塩酸塩 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を超音波により導入し、窩底部からの薬剤の到達距離を蛍光実体顕微鏡 UV フィルターにて観察した。

超音波の出力を 2.0 W から 0.1 W 刻みで最低 0.0 W まで低下させ、1 分照射したところ、1.4 W から薬剤到達距離が激減し、1.3 W 以下では薬剤は全く導入されなかった。また、Optison を含有させない

場合には2.0Wで3分照射しても、薬剤は導入されなかった。次に、超音波出力を1.5Wとし、照射時間を60秒から10秒刻みで減少させたところ、30秒で薬剤到達距離の減少がみられ、0秒では全く薬剤は導入されなかった。

- 5 齶蝕象牙質（変色層）に対して、1.5W、60秒で完全に全面にわたり到達がみられたが、その下の細菌感染のない透明層は細管内が結晶化されているため、到達されなかった。

（2）歯髄組織に及ぼす影響について試験した。Optison 5%含有にて、超音波出力1.5W、照射時間60秒で超音波薬剤導入した直後の
10 歯髄組織を凍結切片を作製し、形態観察を行ったところ、やや血管拡張があるものの、歯髄細胞の熱変性などの傷害性はみられなかった。

（3）細管内の細菌を採取、嫌気性培養後、殺菌効果を検討した。Optisonを5%含有させ、薬剤（タリビット）を、超音波出力1.5W、照射時間60秒で超音波導入した直前、直後の齶蝕象牙質（変色層）をス
15 プーンエキスカにて無菌的に採取した。その産物をカルチュレット（栄研化学）に移しCDC嫌気性菌用血液寒天培地に分離塗抹し、アネロバック・ケンキを入れたアネロバック角形ジャー（三菱ガス）中37℃で嫌気性培養を行い、その後好気性培養を行った。その結果、超音波にてタリビットを導入した場合には、コロニーの発育がみられなかった。タリビットの
20 みで超音波を導入しなかった場合は嫌気性菌およびカンジダの生育がみられ、超音波の有効性が明らかとなった。

実施例 8

歯髄幹細胞の増殖あるいは象牙芽細胞への分化に有効な超音波周波数について検討した。歯髄幹細胞を高速自動細胞解析分取装置にて分離し、浮
25 遊状態にて超音波出力0.1W、照射時間30秒、超音波照射を行い、培養2日後の細胞数をカウントしたところ、非照射に比べて、約3倍の増加がみられた。

実施例 9

感染根管治療における化学的清掃の促進について試験した。齶蝕が歯髄

に達し、炎症や痛みが生じた場合、歯髄は除去（抜髄）せざるを得ない。この際、抜髄後の根管内を無菌化するために、根管内に水酸化カルシウムや抗菌剤を貼薬する。しかしながら、根管の形態は複雑で、特に根尖付近では複根管や側枝が存在し、またしばしば狭窄や湾曲のため、薬剤の到達が困難で完全無菌化が困難である。したがって、根管充填後も細菌は残存し、根尖部歯周組織に細菌が侵入して骨が吸収破壊され、臨床的にも痛みや腫脹が生じる。よって、数年後から十数年後には根管充填材を除去し再び根管内を清掃しなおさねばならない状況がしばしばみられる。すなわち、抜髄ならびに感染根管治療は無菌化を図ることが必須であるが、単に薬剤の貼薬では不十分であり、レーザーでは出力の制御、歯周組織への安全性（熱作用）、細管内深部への到達性が問題となる。

本実施例は、超音波エネルギーを利用して抗菌剤あるいは消毒剤、抗炎症剤を根管壁の象牙細管内に隅々に行き渡らせ、あるいは根尖歯周組織病巣に深く浸透させ、侵入した原性菌を無菌化するものである。細菌を即効的に、化学的ならびに物理的に完全死滅させ、超音波エネルギーにより、歯根膜幹細胞を活性化させ、骨、セメント質および歯根膜の再生力を強化する。あるいはセメント芽細胞分化を促進作用させ、より早期に根尖歯周組織を治癒させるものである。

本実施例の効果は次のとおりである。

1. 狭窄、湾曲根管あるいは副根管、側枝などにも薬剤の効果が期待できる。
2. 象牙細管内に深く浸透するため、象牙質にただ塗布した場合に比べて、細管内深くに存在する細菌により到達しやすく、根管拡大形成量が少なくてすむ。よって、根尖部の拡大形成による機械的刺激、過剰根管充填、破折を防止できる。
3. 超音波造影剤のバブルと併用した超音波の物理的細菌壁の破壊効力により、抗菌剤の薬効が強化される。耐性菌およびトレラント菌の出現を阻止できる。
4. 薬剤の即効性が期待できる。

5. 歯根膜組織幹細胞を活性化し、根尖歯周組織の再生治癒力を強化できる。

実施例 10

1. 細菌に対する効果について試験した。

5 (1) 根管象牙細管内到達距離に及ぼす超音波の出力、照射時間の影響について試験した。ヒト新鮮抜去前歯を用いて、通法に従い、抜髄根管拡大形成し、3%過酸化水素水と5%次亜塩素酸ナトリウムにて交互洗浄後、Optison 5%含有、抗生物質テトラサイクリン塩酸塩 ($100 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) を超音波出力 1.5 W、照射時間 60 秒で導入した。根管壁の象牙細管内への薬剤の到達が蛍光実体顕微鏡 UV フィルターにて観察された。Optison を含有させない場合には 2.0 W で 3 分照射しても、薬剤は導入されなかった。

10 (2) 根管内の細菌を採取、嫌気性培養後、殺菌効果を検討した。Optison を 5% 含有させ、薬剤 (タリビット) を、超音波出力 1.5 W、照射時間 60 秒で超音波導入した直前、直後の根管壁を K ファイルにて無菌的に採取した。その産物をカルチュレット (栄研化学) に移し CDC 嫌気性菌用血液寒天培地に分離塗抹し、アネロバック・ケンキを入れたアネロバック角形ジャー (三菱ガス) 中 37°C で嫌気性培養を行い、その後好気性培養を行った。その結果、超音波にてタリビットを導入した場合には、コロニーの発育がみられなかった。タリビットのみで超音波を導入しなかった場合は嫌気性菌の生育がみられ、超音波薬剤導入の有効性が明らかとなった。

実施例 11

知覚過敏歯の治療について試験した。

25 知覚過敏歯に対して、フッ化ナトリウム、乳酸アルミニウム、硝酸カリウムを超音波により即効性に歯質へ浸透させ、ハイドロキシアパタイトからフルオロアパタイトへの変化を助長し、露出した象牙質の再石灰化を促進し、歯髄神経への刺激伝達を阻害することにより、治癒に向かわせることができる。

本実施例では次の効果が得られる。

1. 薬剤の即効性が期待できる。
2. 象牙細管内に深く浸透するため、象牙質にただ塗布した場合に比べて、到達しやすく、確実な薬効が期待できる。よって、抜髄にいたるのを防止
5 できる。
3. 歯髄組織幹細胞を活性化し、二次象牙質形成を促進できる。

実施例 1 2

歯周組織疾患（歯槽膿漏）の治療について試験した。

- 超音波エネルギーを利用して抗菌剤（タリピットなどのキノロン剤、ミノ
10 サイクリンやアモキシシリンなどのペニシリン系、メトロニダゾールなど）
あるいは消毒剤（グルコン酸クロルヘキシジンなど）、消炎酵素剤（グリチ
ルレチン酸、セラチオペプチダーゼなど）あるいは p l a s m i d 遺伝子
（BMP などの細胞成長因子、転写調節因子）と併用してセメント質内あ
るいは歯周組織内に深く浸透させ、侵入した歯周疾患原性菌を無菌化した。
15 即効性に、化学的ならびに物理的に細菌を完全死滅させてより炎症を鎮め
ると同時に、超音波エネルギーにより、歯根膜組織幹細胞を活性化させ、
歯周組織再生力を強化する。あるいはセメント芽細胞、骨芽細胞の分化を
促進させ、より早期に骨、セメント質を再生させるものである。

本実施例では次の効果が得られる。

- 20 1. 抗菌剤などが歯周組織、セメント質内を通してより深く浸透するため、
歯周ポケットにただ注入した場合に比べて、歯周組織、セメント質、骨内
に深くに存在する細菌により到達しやすい。よって、歯石除去や歯周搔爬
時のセメント質削除量が少なく済み、知覚過敏を引き起こす可能性が減
る。また、歯肉剥離搔爬術などの外科的処置を必要としなくなる。
- 25 2. 超音波造影剤のバブルと併用した超音波の物理的細菌壁の破壊効力により、
抗菌剤の薬効が強化される。耐性菌およびトレラント菌の出現を阻止
できる。
3. 薬剤の即効性が期待できる。
4. 超音波エネルギーにより、歯根膜組織幹細胞が活性化され、歯周組織

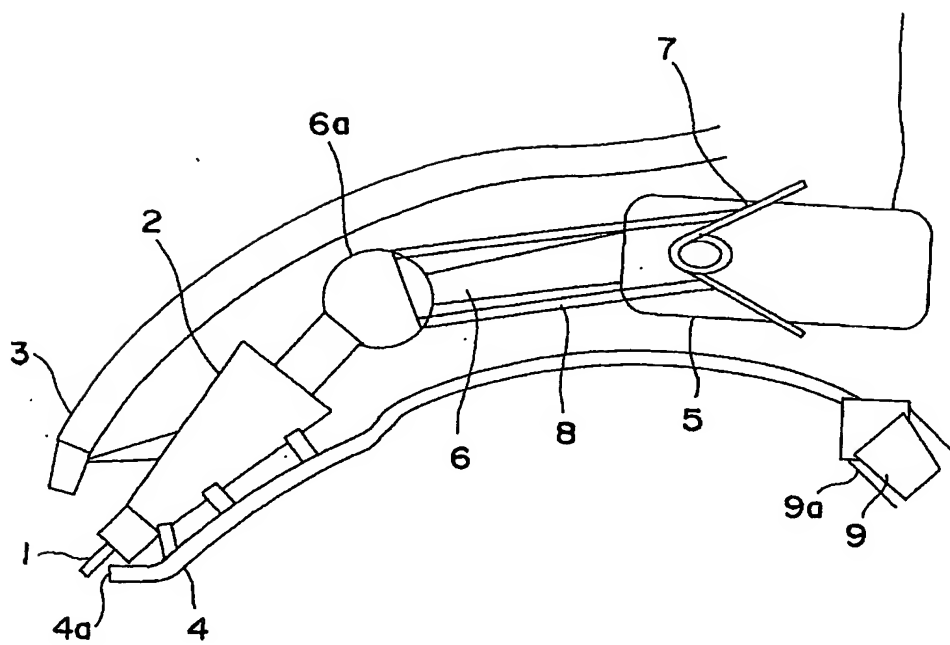
再生力を強化できる。また、セメント芽細胞、骨芽細胞の機能亢進により、歯周疾患により変性したコラーゲンやリン蛋白などの基質蛋白代謝が高まり、再石灰化可能となる。さらに、セメント芽細胞、骨芽細胞の分化促進作用により、より早期にセメント質・骨を再生可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 超音波エネルギーにより歯あるいは歯周組織に導入して治療する混合物であって、プラスミドDNAあるいは薬剤と微小気泡との混合物からなることを特徴とする歯あるいは歯周組織への導入用薬剤。
5
2. 微小気泡の含有量が0.001～10%であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の歯あるいは歯周組織への導入用薬剤。
3. 超音波を歯あるいは歯周組織の標的部に照射する、取り外しできる超音波発振部を先端部に備えた超音波発振器と、標的部に請求の範囲第1項
10 記載の歯あるいは歯周組織への導入用薬剤を供給する薬物押し出し装置とを備えた歯あるいは歯周組織への薬剤導入装置。
4. 超音波発振器の超音波の周波数および強度を調整する調整手段と、周波数を切り替えることで超音波発振方向を自由に選べる操作装置を備えた
15 ことを特徴とする請求の範囲第3項記載の歯あるいは歯周組織への薬剤導入装置。

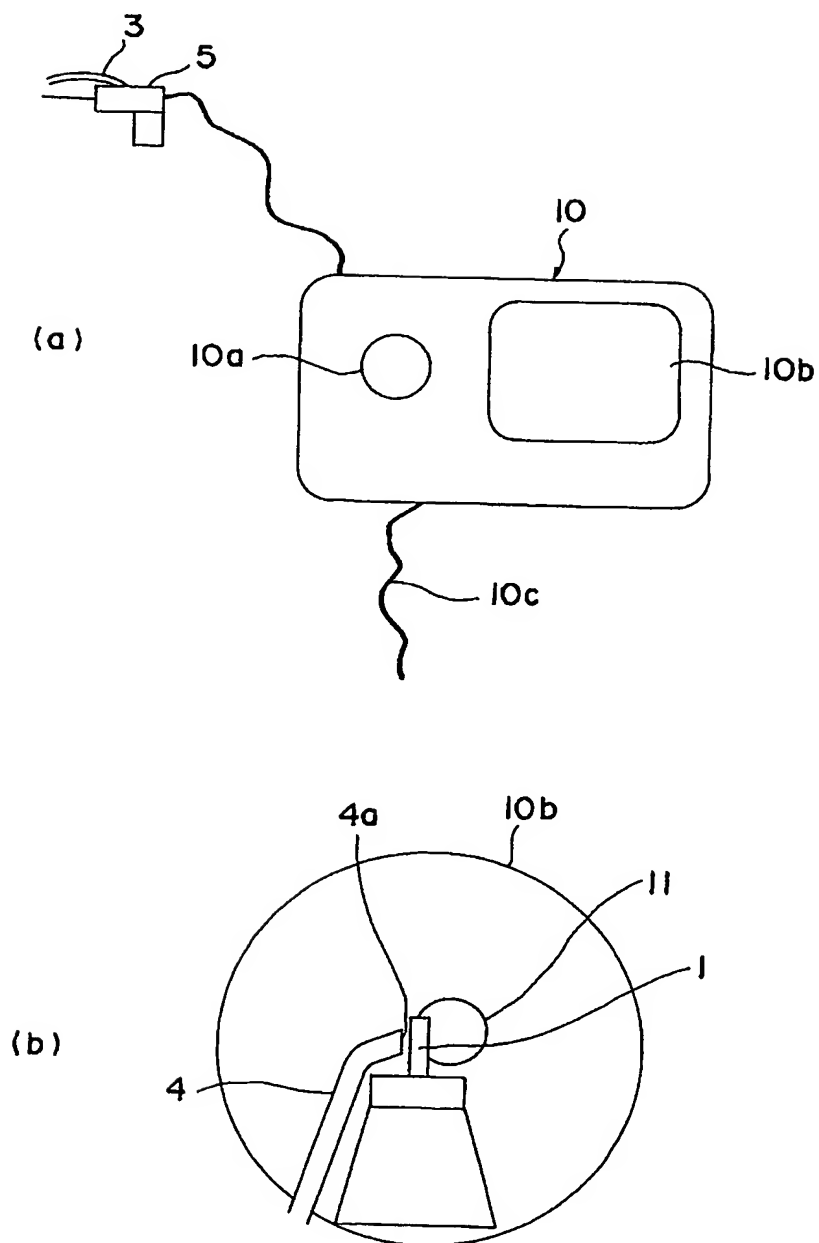
1 / 3

FIG. 1



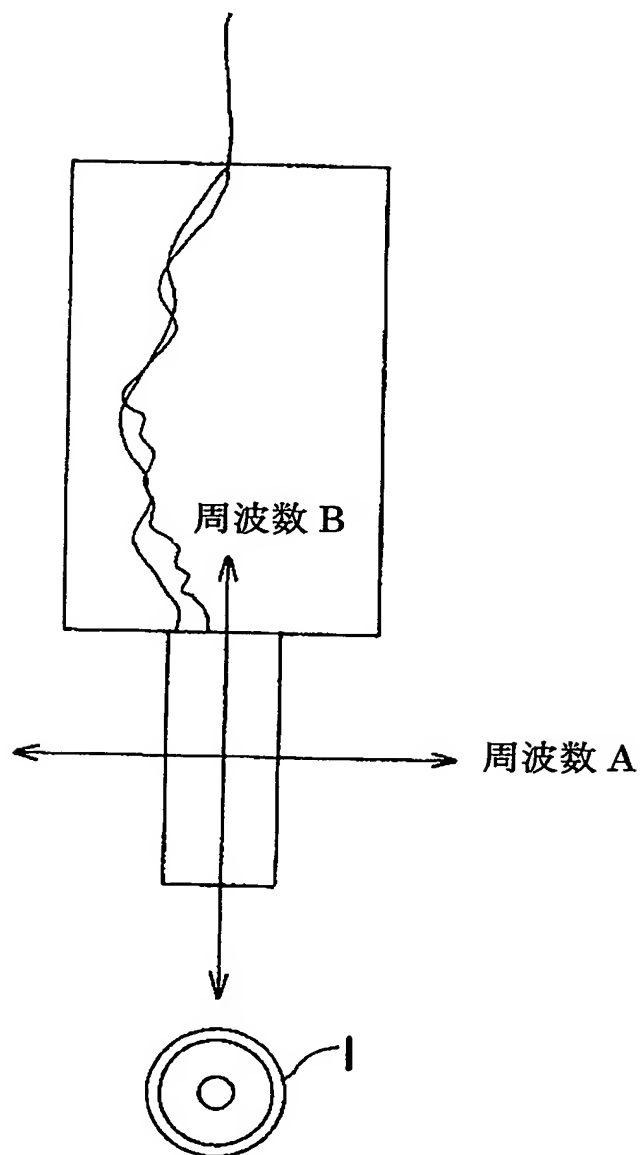
2 / 3

FIG. 2



3 / 3

FIG. 3





(43) 國際公開日
2004 年 6 月 17 日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/049964 A3

- (51) 国際特許分類⁷⁾: A61K 48/00, 41/00, 9/107, 9/127, A61P 1/02, 43/00, A61C 19/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014953

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 21 日 (21.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-339944 2002 年 11 月 22 日 (22.11.2002) JP
特願 2003-389975 2003 年 11 月 19 日 (19.11.2003) JP

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 立花 克郎 (TACHIBANA, Katsuro) [JP/JP]; 〒810-0045 福岡県 福岡市中央区 草香江 2-1-11 エレンシア草香江 201 号 Fukuoka (JP). 中島 美砂子 (NAKASHIMA, Misako) [JP/JP]; 〒813-0014 福岡県 福岡市東区 香椎台 1-18-7 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 小堀 益, 外 (KOHORI, Susumu et al.); 〒812-0011 福岡県 福岡市博多区 博多駅前一丁目 1-1 博多新三井ビル Fukuoka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

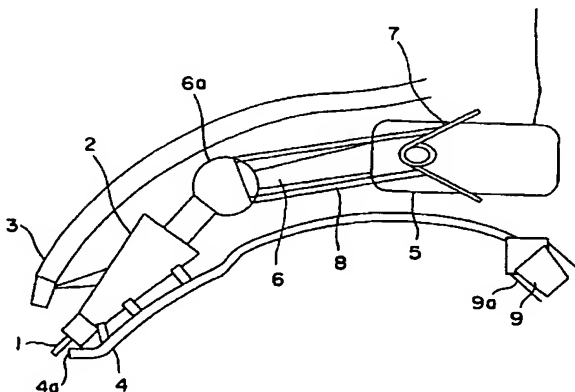
添付公開書類:
— 国際調査報告書

(88) 国際調査報告書の公開日: 2004 年 9 月 23 日

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG TO BE INTRODUCED TOOTH OR PERIODONTAL TISSUE AND APPARATUS FOR INTRODUCING DRUG TO TOOTH OR PERIODONTAL TISSUE

(54) 発明の名称: 歯あるいは歯周組織への導入用薬剤および歯あるいは歯周組織への薬剤導入装置



(57) Abstract: An apparatus for introducing a drug, which is to be introduced into a tooth or a periodontal tissue, into a tooth or a periodontal tissue using an ultrasonic energy and causing little damage. The drug for introduction, which is a mixture to be introduced into a tooth or a periodontal tissue for a therapeutic purpose with the use of an ultrasonic energy and comprises a mixture of plasmid DNA or a drug with fine bubbles, is introduced into the tooth or the periodontal tissue by using an apparatus for drug introduction comprising an ultrasonic wave oscillator having at the tip thereof a detachable ultrasonic wave-oscillating unit whereby the target site of the tooth is irradiated with the ultrasonic wave, and a drug extruder for feeding the drug to be introduced into the tooth toward the target site.



(57) 要約:

本発明は超音波エネルギーにより導入する傷害性の少ない、歯あるいは歯周組織への導入用薬剤の歯あるいは歯周組織の薬剤導入装置であって、導入用薬剤は、超音波エネルギーにより歯あるいは歯周組織に導入して治療する混合物であって、プラスミドDNAあるいは薬剤と微小気泡との混合物からなる導入用薬剤を、超音波を歯の標的部に照射する、取り外しできる超音波発振部を先端部に備えた超音波発振器と、標的部に歯への導入用薬剤を供給する薬物押し出し装置とを備えた薬剤導入装置で歯あるいは歯周組織に導入する。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 41/00, 9/107, 9/127, A61P1/02, 43/00,
A61C19/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 41/00, 9/107, 9/127, A61P1/02, 43/00,
A61C19/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Misako NAKAJIMA et al., "Choonpa o Mochiita	1, 2
Y	BMP Idenshi Donyu Chiryoho ni yoru Zogashitsu Saisei", Nihon Shika Hozongaku Zasshi, 2002 October, Vol.45, No.5, pages 744 to 752, particularly, abstract	3, 4
Y	EP 504881 A2 (Tachibana, Katsuro), 23 September, 1992 (23.09.92), Particularly, abstract; Fig. 2 & JP 5-78260 A Particularly, Fig. 4 & EP 504881 A3 & EP 504881 B1 & EP 504881 B2 & EP 732106 A2 & EP 732106 A3 & US 2003/191446 A1 & CA 2063529 A & AT 146073 E	3, 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 April, 2004 (15.04.04)

Date of mailing of the international search report
27 April, 2004 (27.04.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14953

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-145784 A (Ryuichi MORISHITA), 22 May, 2002 (22.05.02), & WO 03/080123 A1	1-4
A	WO 00/04183 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 27 January, 2000 (27.01.00), & EP 1095159 A1 & US 2003/032098 A1 & JP 2002-520068 A & CA 2334075 A & AU 9949893 A1	1-4
P, X	NAKASHIMA, Misako et al., Induction of Reparative Dentin Formation by Ultrasound-Mediated Gene Delivery of Growth/Differentiation Factor 11, Human Gene Therapy, 2003, Vol.14, No.6, pages 591 to 597	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K 48/00, 41/00, 9/107, 9/127, A61P1/02, 43/00, A61C19/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K 48/00, 41/00, 9/107, 9/127, A61P1/02, 43/00, A61C19/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	中島 美砂子 等、超音波を用いたBMP遺伝子導入治療法による 象牙質再生、日本歯科保存学雑誌、2002年10月、第45巻、 第5号、第744-752ページ、 特に、Abstract	1, 2 3, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 04. 2003

国際調査報告の発送日

27. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

津原 下 浩 印

4 C

9 2 8 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 504881 A2(Tachibana, Katsuro)1992.09.23 特に、Abstract, Fig.2 & JP 5-78260 A 特に、【図4】 & EP 504881 A3 & EP 504881 B1 & EP 504881 B2 & EP 732106 A2 & EP 732106 A3 & US 2003/191446 A1 & CA 2063529 A & AT 146073 E	3, 4
A	JP 2002-145784 A(森下竜一)2002.05.22 & WO 03/080123 A1	1 - 4
A	WO 00/04183 A1(HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2000.01.27 & EP 1095159 A1 & US 2003/032098 A1 & JP 2002-520068 A & CA 2334075 A & AU 9949893 A1	1 - 4
P X	NAKASHIMA, Misako et al., Induction of Reparative Dentin Formation by Ultrasound -Mediated Gene Delivery of Growth/Differentiation Factor 11, Human Gene Therapy, 2003, Vol.14, No.6, pp.591-597	1 - 4